

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390015

研究課題名(和文) N-アセチルグルコサミン修飾による核内タンパク質の機能制御に関する研究

研究課題名(英文) Regulation of nuclear protein functions by N-acetylglucosamine modification

研究代表者

山本 一夫 (Yamamoto, Kazuo)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：20174782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：核内タンパク質に付加されるO-GlcNAc修飾を特異的に検出するために、マメ科レクチンライブラリーから特異的な改変レクチンプローブを取得した。また、N-アセチルガラクトサミン転移酵素を核内で発現させO-GlcNAcを伸長させた後に、新たに発見しこの糖鎖に特異的なレクチンをプローブとして、高感度に検出する新規の手法も確立した。これらの手法と質量分析を組み合わせ、数多くの修飾タンパク質を同定し、10種類の新規のO-GlcNAc修飾タンパク質を見出した。また、修飾アミノ酸残基を質量分析で高感度に特定する手法や修飾ペプチドの精製方法を確立し、レクチンGFPによるライブイメージング等も検討した。

研究成果の概要(英文)：O-GlcNAcylation of nuclear proteins is a unique reaction in several points of view. O-GlcNAcylation levels are modulated in response to cellular signaling and affect protein localization, activity and stability. We screened engineered lectins to monitor O-GlcNAc modification using mammalian cell surface display from randomized lectin library. Furthermore, we expressed a soluble form of  $\beta$ -N-acetylgalactosaminyltransferase in the nucleus to change O-GlcNAc to GalNAc-GlcNAc. A novel lectin specific for GalNAc-GlcNAc was purified from Wisteria japonica seeds. Using these lectins as a probe, we identified more than 80 kinds of O-GlcNAc-modified proteins including 10 kinds of novel proteins from the nuclear and cytosolic fractions. O-GlcNAc-modified peptides were purified by lectin affinity chromatography and identified O-GlcNAc-modified residues by mass spectrometry. A lectin-GFP was expressed in the cytoplasm for monitoring O-GlcNAcylation in a live cell during cell activation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：N-アセチルグルコサミン修飾 核内タンパク質 レクチン イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の糖鎖修飾の中で、唯一細胞質内で起こるものが、セリン、スレオニン残基の  $\beta$ -*N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) 修飾である。この糖は伸長反応が起こらず、タンパク質のリン酸化やメチル化と類似の可逆的な反応である点、また生物種間で広く保存されている点で、従来の糖タンパク質糖鎖と大きく性質を異にしている (図 1)。核内タンパク質の *O*-GlcNAc 修飾が発見された当初は、リン酸化と競合する修飾と考えられていた。しかしながら、最近、ヒストンや転写因子などの *O*-GlcNAc 修飾が細胞の分化や増殖を誘導するシグナルとして関与することを示唆する報告がなされ、ヒストンの *O*-GlcNAc 修飾は、メチル化やアセチル化と同様のヒストンコードの一つと捉える提案もなされた。このような中、*O*-GlcNAc 修飾の解析には、まだいくつもの困難がある。第一に、*O*-GlcNAc を特異的に検出するプローブが存在しないことである。現在、WGA レクチンや化学的に *O*-GlcNAc 修飾した BSA を免疫原として作成した抗体が利用されている。しかし、前者はシアル酸を含む糖鎖にも反応するため多くの膜タンパク質が強く結合すること、後者は反応が確認できたタンパク質は存在するが、全ての *O*-GlcNAc 修飾タンパク質を網羅できないという欠点がある。第二に、*O*-GlcNAc 修飾は *O*-GlcNAc 転移酵素 (OGT) と *O*-GlcNAc 加水分解酵素 (*O*-GlcNAcase) で触媒される可逆的な反応であり、ごく一部の核内あるいは細胞質内タンパク質のみしか修飾を受けていないことから、微量で修飾部位の特定が難しいことである。第三に、*O*-GlcNAcase の阻害剤である PUGNAc、OGT の阻害剤であるストレプトゾトシンなどを用いたアプローチが存在する。しかし、前者は特異性が低くグルコースの関連した反応に広く影響を及ぼすこと、後者は特定のタンパク質上の *O*-GlcNAc 修飾のみを制御することができない欠点がある。また抗体も単に糖鎖のみを認識するわけではなく、*O*-GlcNAc 修飾を受けたペプチ

ドも含めて認識していると考えられ、全ての *O*-GlcNAc 修飾タンパク質を網羅することができない。これらの問題点を解決する鍵は、*O*-GlcNAc 修飾を特異的に認識できるプローブの有無に大きく依存している。

	general glycosylation	<i>O</i> -GlcNAc modification
subcellular regions	ER and Golgi lumen	cytoplasm and nucleus
reversibility	irreversible	reversible
elongation	○	×

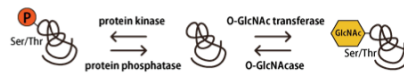


図 1. 一般的な糖鎖修飾と *O*-GlcNAc 修飾の相違

### 2. 研究の目的

cell surface display の系を用いて、植物マメ科レクチンをスキヤフォールドとして、新規の糖結合特異性を持つ改変レクチンの作製を通して新規の糖鎖プローブを作成する。具体的には、改変レクチンライブラリーの中から *O*-GlcNAc を特異的に認識するレクチンをスクリーニング、これを用いて解析の困難であった *O*-GlcNAc 修飾された転写因子やヒストンなどの核あるいは細胞質内に存在するタンパク質を網羅的に単離・精製し同定を行い、詳細な生化学的解析を行うことを目的とする。また、*O*-GlcNAc 修飾アミノ酸の同定を行い、修飾の量的な変化を追跡できる系の確立も目指す。さらに、*O*-GlcNAc 修飾アミノ酸をアラニンに置換した変異体や相互作用するタンパク質の変異体を作成し細胞内に発現させることにより、分化・増殖にどのような影響を及ぼすか、また、クロマチン構造の変化、ヒストンなどの細胞内における局在 (クロマチンへの取り込みなど) にどのような影響を及ぼすかなどについて検討する。これらの多角的なアプローチにより、最終的に「*O*-GlcNAc ワールド」の全容を明らかにすることを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) マメ科レクチン PNA の糖結合ドメインをコ

ードするループ C 並びにループ D をコードする cDNA にランダムな変異を導入するとともに、CD3 $\zeta$  の細胞質ドメイン、及び CD8 の膜貫通ドメインを融合させた改変レクチン cDNA ライブラリーを作成した。この cDNA を pMXs 発現ベクターに挿入し、Plat-E パッケージング細胞にトランスフォーメーションし、その培養上清から組換え体ウイルス粒子を回収した。次にこのウイルス溶液を GFP レポーター細胞 2B4 に感染させ、膜結合型の改変レクチンを 2B4 細胞の表面に発現させた。この cell surface display の発現系を用いて、 $\beta$ -GlcNAc 糖鎖ポリマーをコートした ELISA プレート上で、改変レクチン発現 2B4 細胞を培養、GFP の発現誘導を指標に、 $\beta$ -GlcNAc 結合性レクチン発現細胞をセルソーターにより濃縮した。濃縮した細胞は拡大培養したのち、上記のアッセイ法を 3, 4 回繰り返して行うことにより、GFP 陽性の細胞を濃縮した。別法として、GFP 陽性の 2B4 細胞を、1 つずつマニピレーターで単離する方法も試みた。単離した細胞は、限界希釈法によってクローン化をし、得られた個々の細胞クローンの特異性を、種々の糖タンパク質、糖鎖ポリマーとの反応性により特異性を精査した。改変レクチン遺伝子の単離は、改変レクチン遺伝子の前後の塩基配列をプライマーとし、改変レクチン遺伝子を PCR にて増幅して、その塩基配列を決定した。

(2)  $\beta$ 3 および  $\beta$ 4GalNAc 転移酵素に核局在シグナルを付加した可溶性の酵素をコードした cDNA を作成し、pCAGGS ベクターに挿入した。このベクターを HEK293 細胞に発現させ、O-GlcNAc 修飾を GalNAc-GlcNAc に伸長させることを試みた。この細胞内で O-GlcNAc の伸長が起こっているか確認するために、既知のタンパク質であるヒストンを単離して、その伸長の有無について、レクチンブロッキングや抗体染色を用いて比較検討した。

(3) GalNAc-GlcNAc の糖鎖に特異的なレクチンは知られていないため、これに特異的なレクチンの探索を行った。ナツフジの種子から、硫安

沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーにより、新規のレクチン WJA を単離した。また、lysylendopeptidase, Asp-N, トリプシン消化後のペプチド断片を HPLC で分離・分取した後、プロテインシーケンサーでアミノ酸配列を決定した。また、ナツフジ種子の cDNA ライブラリーを作成し、アミノ酸配列に基づき、cDNA の単離を行った。また、比較のために、小麦胚芽レクチン WGA の cDNA の取得も同様に行った。

(4) 可溶性 GalNAc 転移酵素を発現させた細胞から細胞質画分及び核画分を作製し、二次元電気泳動を行った後、ブロッキングしたメンブレンを WJA レクチン染色をし、O-GlcNAc 修飾タンパク質を検出した。また、WJA レクチンを大量に精製し、固相化したアフィニティカラムを作成して、O-GlcNAc 修飾タンパク質の単離・精製をなした。また、可溶性 GalNAc 転移酵素を発現させた細胞からヒストンを精製した後、トリプシン消化によりペプチドに断片化し、MALDI-TOF/TOF 質量分析により O-GlcNAc 修飾ペプチドを追跡した。また、c-Re1 タンパク質の O-GlcNAc 修飾を解析をするために、細胞ライセートから抗体により免疫沈降し、SDS 電気泳動により分離した。同様にトリプシンで消化し、アミノ酸配列及び O-GlcNAc 修飾の位置を、質量分析計 MALDI-TOF/TOF 質量分析計を用いて同定した。

(5) 改変レクチンのシグナル配列を除去し、核移行シグナル配列を付加した改変レクチン遺伝子を作製、3' 側には GFP タンパク質遺伝子を融合させ、これを pRcCMV ベクターに組み込んだ。同様に、WGA の GFP 融合タンパク質をコードする cDNA を作成し、同様に発現ベクターに組み込んだ。作成したプラスミドを、HEK293 細胞に形質転換し、安定発現細胞株を取得した。細胞内の特に核内に改変レクチンが発現しているかを、ウエスタンブロッキングや抗 GFP 抗体染色で確認する。次に、実際に核内に目的とする改変レクチンの蛍光が観察されるかを、蛍光顕

微鏡で確認した。

(6) O-GlcNAc 修飾分子の O-GlcNAc 修飾アミノ酸を Ala に置換した変異体を細胞内で過剰発現させ、分化や増殖に及ぼす影響を調べた。コントロールとして、他の O-GlcNAc 修飾反応に影響のないことを、mock 発現細胞と比較した。その条件下で、このドミナントネガティブ変異体の細胞内での局在の変化、分化や増殖に対する影響を wild-type と比較することにより、O-GlcNAc 修飾の生物学的意義を明確にすることを最終目標とする。

#### 4. 研究成果

(1) ピーナッツレクチン(PNA) の糖結合部位を構成する C および D ループに、ランダムなアミノ酸で置換する改変レクチン cDNA ライブラリーを作成した。また、2つのループの長さが1~4アミノ酸延長したライブラリーなど、合わせて 11 種類のライブラリー約  $2 \times 10^7$  を作成した。このライブラリーをレトロウイルス発現系を用いて 2B4 レポーター細胞に感染させ、細胞表面に改変レクチンライブラリーを発現させた細胞とした。GlcNAc-PAA を固相化したウエル上で一晩培養すると、GlcNAc に結合する改変レクチンを発現した細胞では、細胞内に GFP 蛍光タンパク質を誘導するため、GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで分取した。陽性細胞はクローン化した後、それぞれの細胞から導入した改変レクチン遺伝子を PCR にて増幅し、最終的に改変レクチンの遺伝子を明らかにした。これらの改変レクチンは、大腸菌発現系では封入体をつくり活性のある物が取得できなかったが、ヒト IgG-Fc 融合タンパク質として発現させることにより、活性を持つ改変レクチンが得られた。この改変レクチン-Fc 融合タンパク質を用いて HEK293 細胞のライセートを用いてレクチンブロットニングを行ない、O-GlcNAc 修飾タンパク質の特定を行った。その結果を踏まえて、タンパク質の同定、さらには O-GlcNAc 修飾アミノ酸残基の特定を行うには、O-GlcNAc 修飾タンパク

質あるいはペプチドをアフィニティークロマトグラフィーで大量に得る必要があるため、新たなアプローチも同時に行った。

(2)  $\beta 3$  および  $\beta 4$ GalNAc 転移酵素に核局在シグナルを付加して細胞質に発現させると、O-GlcNAc は GalNAc-GlcNAc (disaccharide-tag) へと伸長し、可逆反応が不可逆となり、修飾タンパク質が蓄積することが予想される。また、糖鎖部分が長くなることによりレクチンとの親和性が強くなり、アフィニティー精製もより効率上がるのが期待される。そのため、この糖配列にも結合することが報告されているノダフジレクチン (WFA) の cDNA を単離して上記と同じ方法で改変レクチンの作成を行うこととした。その過程で、ナツフジ (*Wisteria japonica*) の種子から、偶然、GalNAc  $\beta 1$ -3GlcNAc 及び GalNAc  $\beta 1$ -4GlcNAc にのみ特異的に結合するレクチンを見出した。このレクチン WJA はガラクトースにも結合する WFA とは異なり、上記2糖に特異的であり、大量精製も可能である点など、さまざまな利点があった。この WJA を用いた GalNAc 転移酵素を発現させた細胞質及び核画分を用いて二次元電気泳動を行い、レクチンブロットニングを行ったところ、改変レクチンと同様に 80 種類以上の特異的に染色されるスポットを見出した (図 2)。

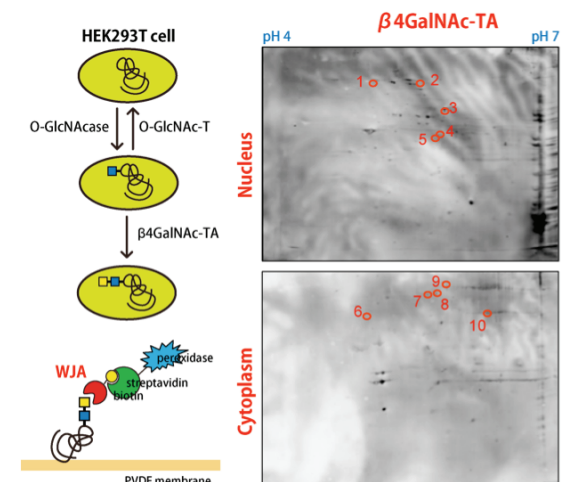


図 2 O-GlcNAc 修飾タンパク質の WJA 染色

(3) 上記で特定したこれらのスポットを切り出して、トリプシンでゲル内消化を行い、MALDI-TOF/TOF 質量分析計でタンパク質の同定

を行い、今までに報告のない新たな 10 種類の *O*-GlcNAc 修飾タンパク質を特定した。*O*-GlcNAc 修飾アミノ酸残基の特定には、既に報告のあるタンパク質を用いて確認をする必要があった。そこで、ヒストン H1~H4 を用いて同様の実験を行った。その結果、*O*-GlcNAc 修飾が知られている H2A, H2B, H3, H4 では WJA に強く染色され、修飾のない H1 は染色されなかった。さらに *O*-GlcNAc 修飾アミノ酸をもつペプチドのアフィニティー精製を試みた。上記のヒストンをトリプシンで消化し、WJA を固相化したアフィニティークラムにのせ、吸着画分を高濃度のラクトースで溶出した。各フラクションを集め、その一部を逆相 HPLC で分析したところ、2つの糖ペプチドを検出した (図 3)。逆相カラムでは短い糖ペプチドは保持されない可能性があり、量的な検出限界の問題と合わせて検討する必要も明らかになった。

別のタンパク質として、c-Rel についても同様の解析を行った。このタンパク質は *O*-GlcNAc 修飾が一つであることが報告されているが、その報告通り、Ser350 の 24%が GalNAc-GlcNAc で、38%が *O*-GlcNAc 修飾、残りが未修飾であることが質量分析の結果から明らかになった。

(4) 核内あるいは細胞質内のタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾が、細胞の活性化やストレス負荷などに呼応して変化するかを時・空間的に可視化することは大きな意義がある。そこで、レクチンを GFP 融合タンパク質として細胞質内に発現させ、蛍光を観察することで *O*-GlcNAc 修飾タンパク質の増減や局在を調べた。取得した cDNA クローンは WJA のペプチドの配列と類似していたが、完全に一致しているものは得られなかった。そこで、小麦種子の cDNA から小麦胚芽レクチン WGA の cDNA を PCR で増幅し、正しい cDNA を取得した。この cDNA を用いて同様に GFP 融合タンパク質をコードするキメラ cDNA を作成し、ベクターに組み込んで細胞質内に発現させた。この場合、*O*-GlcNAc 修飾を検出していると想定されるが、自家蛍光と思われる変動も多く、別

の蛍光タンパク質での検討が必要であった。

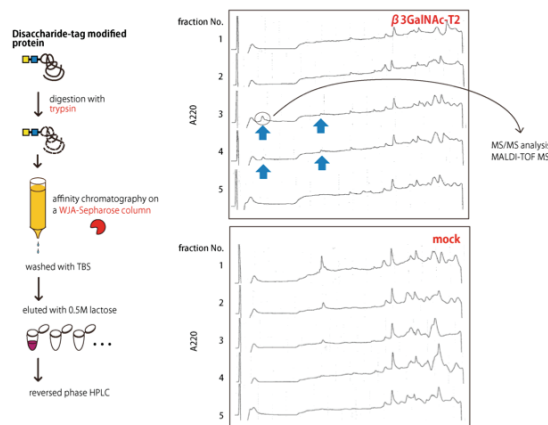


図 3. *O*-GlcNAc 修飾ペプチドのアフィニティー精製

(5) 特定のタンパク質の *O*-GlcNAc 修飾の意義を調べるために、同定した *O*-GlcNAc 修飾アミノ酸残基 Ser を Ala に置換した変異体 cDNA を作成し、これを細胞内で過剰発現させることにより、何らかの機能の抑制あるいは亢進が観察されないかを検討した。*O*-GlcNAc 修飾により、相互作用するタンパク質が変化する例が報告されているので、OGT 過剰発現条件下で c-Rel と免疫沈降してくるタンパク質の量に変動はないかを調べたところ、複数のバンドにより異なっていた。観察されたバンドが特異的な結合であるのかを個々のタンパク質に関して調べる必要があること、内在性の c-Rel の影響を個々のタンパク質に関して定量的に見積もることが今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Takeda, K., Qin, S., Matsumoto, N., Yamamoto, K.: Association of malectin with ribophorin I is crucial for attenuation of misfolded glycoprotein secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 454, 436-440 (2014). DOI 10.1016/j.bbrc.2014.10.102
- ② Yamamoto, K.: Intracellular lectins are involved in quality control of glycoproteins (review). *Proc. Jap. Acad. Ser. B.* 査読有 90, 67-82 (2014). DOI 10.2183/pjab.90.67

- ③ Soga, K., Teruya, F., Tateno, H., Hirabayashi, J., Yamamoto, K.: Terminal N-acetylgalactosamine-specific leguminous lectin from *Wisteria japonica* as a probe for human lung squamous cell carcinoma. PLoS ONE 査読有 8(12) e83886 (2013). DOI 10.1371/journal.pone.0083886
- ④ Chen, Y., Hojo, S., Matsumoto, N., Yamamoto, K.: Regulation of Mac-2BP secretion is mediated by its N-glycan binding to ERGIC-53. Glycobiology 査読有 23, 904-916 (2013). DOI 10.1093/glycob/cwt027
- ⑤ S. Qin, S.-Y., Hu, D., Matsumoto, K., Takeda, K., Matsumoto, N., Yamaguchi, Y., Yamamoto, K.: Malectin forms a complex with ribophorin I for enhanced association with misfolded glycoproteins. J. Biol. Chem. 査読有 287, 38080-38089 (2012). DOI 10.1074/jbc.M112.394288
- [学会発表] (計 4 件)
- ① Yamamoto, K. A novel method to identify O-GlcNAcylated proteins using a soluble N-acetylgalactosaminyltransferase. 2nd International symposium on protein modifications in pathogenic dysregulation of signaling. 東京大学医科学研究所大講堂 (東京都、港区) 1 月 23 日～1 月 24 日 (2015 年)
- ② 山本一夫 核移行糖転移酵素を用いた核内 N-アセチルグルコサミン修飾タンパク質同定方の確立 第 65 回日本電気泳動学会総会 横浜情報文化センター (神奈川県、横浜市) 10 月 24 日～10 月 25 日 (2014 年)
- ③ 山本一夫 マメ科レクチンのスクャフォールド解析 第 87 回日本生化学会大会 国立京都国際会館 (京都府、京都市) 10 月 15 日～10 月 18 日 (2014 年)
- ④ 曾我慶介、山本一夫 糖鎖認識のための分子基盤: スキャフォールド解析から見たこと 第 33 回日本糖質学会年会 名古屋大学豊田講堂 (愛知県、名古屋市) 8 月 10 日～8 月 12 日 (2014 年)

[図書] (計 3 件)

- ① Yamamoto, K.: Assessment of weak sugar-binding ability using lectin tetramer and membrane-based glycans. Methods Mol Biol. 1200, 413-418 (2014). DOI 10.1007/978-1-4939-1292-6\_36
- ② Yamamoto, K.: Carbohydrate-binding specificity of lectins using multiplexed glyco-bead array. Methods Mol Biol. 1200, 319-326 (2014). DOI 10.1007/978-1-4939-1292-6\_27
- ③ Kobayashi Y, Tateno H, Ogawa H, Yamamoto K, Hirabayashi J.: Comprehensive list of lectins: origins, natures, and carbohydrate specificities. Methods Mol Biol. 1200, 555-77 (2014). DOI 10.1007/978-1-4939-1292-6\_45

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/iyakuhome/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 一夫 (YAMAMOTO, Kazuo)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号: 20174782

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし